

О. В.ТИТКО¹, Н. П.КАНУННИКОВА^{1,2}, Д. С.СЕМЕНОВИЧ³

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА И ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

¹ Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», Гродно, Республика Беларусь

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Были исследованы показатели окислительного стресса и энергетического обмена в крови и больших полушариях мозга крыс в модели нейродегенеративной патологии, осуществляемой посредством введения животным 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК), а также протекторные свойства производных пантотеновой кислоты. Установлено, что введение 3-НПК приводит к развитию окислительного стресса не только в головном мозге, но и на уровне всего организма. При этом происходят значительные изменения и энергетического метаболизма, и пентозофосфатного пути в больших полушариях мозга. Пантенол и пантетин, вводимые на фоне действия 3-НПК, проявляют защитные эффекты в отношении показателей окислительного стресса и энергетического метаболизма не только в больших полушариях мозга, но и возвращают показатели окислительного стресса и карбонилирования белков в плазме крови к значениям контрольной группы. ГПК действует слабее на вышеуказанные отклонения как в крови, так и в мозге.

Ключевые слова: окислительный стресс, энергетический метаболизм, большие полушария мозга, 3-нитропропионовая кислота, нейродегенеративные заболевания.

Введение. Нейродегенеративные заболевания, представляющие серьезную проблему здравоохранения в наше время, характеризуются прогрессирующим повреждением нервных клеток и гибелью нейронов, что приводит к нарушениям двигательной и/или когнитивной функции [1]. Сложный патогенез нейродегенеративных заболеваний остается в значительной степени неизвестным, однако все больше данных свидетельствует о том, что продукты свободнорадикального окисления могут играть решающую роль в иницировании процессов нейродегенерации [2]. Хотя активные формы кислорода (АФК) и/или активные формы азота (АФА) могут и не быть пусковым фактором развития нейродегенеративных заболеваний, они могут усугубить прогрессирование заболевания за счет окислительного повреждения и взаимодействия с митохондриями [2, 3]. В физиологических условиях уровень АФК, генерируемых в митохондриях, поддерживается на относительно постоянном уровне благодаря эндогенным антиоксидантам [4].

Развитие ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона (БХ), связано с мисфолдингом и накоплением нерастворимых комплексов таких белков в виде телец Леви, хантингтина и др. [1]. Агрегация этих модифицированных белков, в свою очередь, может вызвать воспалительную реакцию в мозге, которая индуцирует образование АФК и нарушения энергетического метаболизма [4–6]. У пациентов с БХ отмечается снижение потребления глюкозы и повышение уровня лактата, а также прямое ингибирующее воздействие на дыхательный комплекс II [7, 8].

Одним из способов моделирования метаболических нарушений, характерных для нейродегенеративной патологии, является введение животным 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК), которая вызывает избирательную дегенерацию нейронов в стриатуме и развитие симптомов, характерных для БХ [9]. Есть сведения, что ее нейротоксическое действие связано с необратимым ковалентным связыванием с субъединицей 70 кДа сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и угнетением

активности фермента [10]. Системное введение НПК крысам снижает содержание восстановленного глутатиона и увеличивает продукцию гидроксильных радикалов и нитротирозина, а также способствует образованию карбонилированных белков в пораженном полосатом теле мозга [11, 12]. Как показано нами ранее, введение производных пантотеновой кислоты, уменьшает нарушения окислительно-восстановительного потенциала системы глутатиона в мозге при окислительном стрессе [12, 13].

Цель работы – изучение показателей окислительного стресса и энергетического метаболизма в крови и мозге при моделировании нейродегенерации на крысах. В задачу работы входила оценка нейропротекторных свойств производных пантотеновой кислоты в данной модели.

Материалы и методы исследования. Были использованы крысы-самки линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 150–180 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Все эксперименты с лабораторными животными выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Крысы были разделены на 5 экспериментальных групп ($n=7$). Животным первой группы вводили воду (контроль). Животные второй, третьей, четвертой и пятой групп получали 3-НПК. Препарат вводили в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг внутривентрикулярно. Крысам третьей группы на фоне 3-НПК вводили пантенол (ПЛ), четвертой группе – пантетин (ПТ), а животным пятой группы на фоне 3-НПК вводили гомопантотенат кальция (ГПК). Препараты Д-пантенол, Д-пантетин и гомопантотенат кальция вводили внутримышечно в дозе 200 мг/кг (0,5 мл) в течение 14 дней. После декапитации крыс собирали кровь в присутствии гепарина и извлекали мозг, из которого выделяли большие полушария.

Содержание свободнорадикальных продуктов, реагирующих с N,N-диметил-п-фенилендиамином (ДФАРС), в плазме крови оценивали по методу [14]. Общую антиоксидантную активность плазмы крови (ОАА) определяли по методу Стокса [15]. Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали спектрофотометрически по содержанию альдегидфенилгидразонов (регистрация при 274 нм) и кетондинитрофенилгидразонов (регистрация при 363 нм) белков в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [16].

Содержание тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС) в мозге определяли по методу [17]. При этом в одной аликвоте супернатанта после немедленного торможения ПОЛ путем добавления бутилгидрокситолуола и ТБК-реактанта определяли базальный уровень ТБКРС для оценки исходного уровня карбонильных продуктов ПОЛ, в другой – после 30 минут инкубации при 37° определяли спонтанный уровень ТБКРС для оценки наработки карбонильных продуктов ПОЛ, а в третьей – после добавления активатора ПОЛ – Fe-аскорбат-индуцированный уровень ПОЛ.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [18], 2-оксоглутаратдегидрогеназы (2-ОГДГ) [19] и цитохром С-оксидазы [20] в ткани структур мозга определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве акцептора электронов феррицианид калия. Активность аконитазы измеряли ферментативным методом [21].

Для оценки интенсивности метаболизма по пентозофосфатному пути определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) спектрофотометрически с использованием НАДФ [22].

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного нами эксперимента установлено, что введение 3-нитропропионовой кислоты приводило к активации процессов свободнорадикального окисления липидов в плазме крови, о чем свидетельствует повышение содержания ДФАРС в плазме на 53 % ($p<0,05$) (таблица 1). Введение ПЛ или ГПК на фоне 3-НПК приводило к возвращению уровня ДФАРС до их содержания в контрольной группе, тогда как эффект ПТ на этот показатель был значительно слабее. В плазме крови 3-НПК вызывал также изменения карбонилирования белков. Так, отмечалось уменьшение содержания карбонильных форм белков: альдегидфенилгидразонов на 12 % ($p<0,05$) и кетондинитрофенилгидразонов практически в 2 раза ($p<0,05$). Введение на этом фоне ПЛ, ПТ или ГПК приводило к возвращению уровня альдегидфенилгидразонов практически до значений в контроле, тогда как содержание кетондинитрофенилгидразонов оставалось сниженным при действии ПЛ, практически возвращалось к контрольным значениям при действии ГПК, но оказалось выше контрольных значений на фоне введения ПТ.

Табл. 1. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на окислительную модификацию белков (ОМБ) и уровень ДФАРС в плазме крови ($M \pm SD$)

Группы	Альдегидфенилгидразоны, ед.опт.пл./мл плазмы	Кетондинитрофенилгидразон ы, ед.опт.пл./мл плазмы	ДФАРС, мкмоль/мл плазмы
Контроль	50,98 $\pm$ 1,75	3,07 $\pm$ 0,14	102,4 $\pm$ 8,62
НПК	44,64 $\pm$ 1,29*	1,70 $\pm$ 0,11*	156,9 $\pm$ 11,15*
НПК+ПЛ	45,43 $\pm$ 1,05*	1,49 $\pm$ 0,18*	97,90 $\pm$ 6,93#
НПК+ПТ	48,81 $\pm$ 1,11	4,21 $\pm$ 0,40*#	137,7 $\pm$ 13,68*#
НПК + ГПК	48,46 $\pm$ 0,85	2,65 $\pm$ 0,06#	113,5 $\pm$ 9,35#

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК

Выраженный сдвиг окислительно-восстановительного баланса на фоне введения 3-НПК происходил также в больших полушариях мозга крыс. Показателем этого является повышение базального (на 61 %), спонтанного (на 54 %) и железо-аскорбат-индуцируемого (на 21 %) содержания ТБКРС в этой структуре (таблица 2). ПЛ и ПТ способствовали возвращению вышеуказанных показателей до значений в контрольной группе, тогда как влияние ГПК по нормализации перекисного окисления липидов в мозге оказалось более слабым. Активация ПОЛ при действии 3-НПК сопровождалась почти двукратным снижением общей антиоксидантной активности в больших полушариях мозга (рисунок). ПЛ и ПТ, но не ГПК приводили к восстановлению антиоксидантной активности.

Табл. 2. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на содержание ТБК-реагирующих соединений (ТБКРС, нмоль/мг белка) в больших полушариях мозга ($M \pm SD$)

Группы	Базальный уровень ТБКРС	Спонтанный уровень ТБКРС	Fe(II)/аскорбат- индуцированный уровень ТБКРС
Контроль	1,22 $\pm$ 0,12	4,21 $\pm$ 0,24	10,82 $\pm$ 0,42
НПК	1,97 $\pm$ 0,08*	6,48 $\pm$ 0,32*	13,12 $\pm$ 0,56*
НПК+ПЛ	1,32 $\pm$ 0,10#	4,76 $\pm$ 0,34#	11,75 $\pm$ 0,51#
НПК+ПТ	1,40 $\pm$ 0,11#	4,45 $\pm$ 0,32#	11,83 $\pm$ 0,50#
НПК + ГПК	1,77 $\pm$ 0,09*	5,65 $\pm$ 0,30*#	12,88 $\pm$ 0,78*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК.

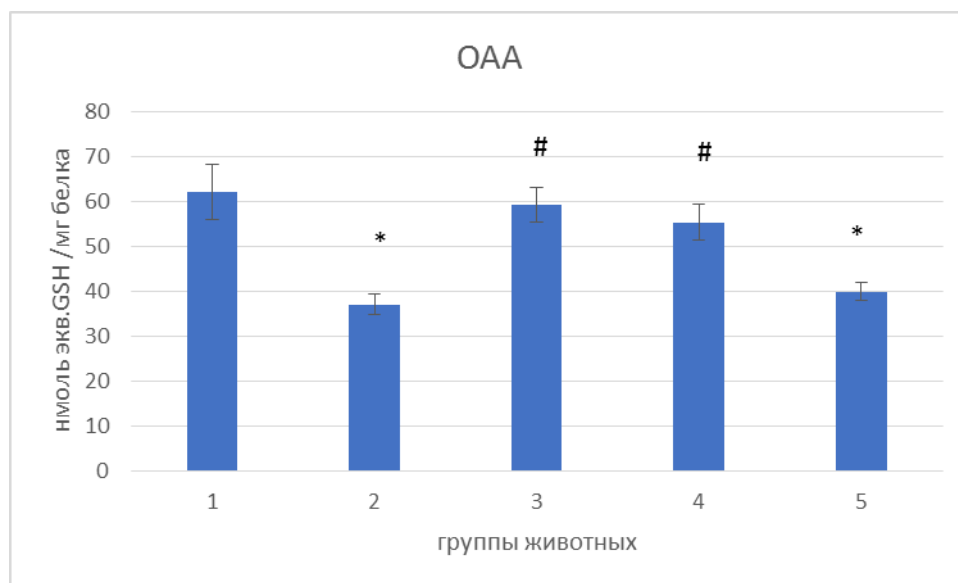


Рис. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на общую антиоксидантную активность (ОАА) в плазме крови. Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК. Группы : 1 – контроль, 2 – НПК, 3 – НПК+ПЛ, 4 – НПК+ПТ, 5 – НПК + ГПК.

Изучение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования в митохондриях больших полушарий мозга при введении 3-НПК показало значительное снижение активности СДГ (на 48 %) (таблица 3), что подтверждает данные литературы о выраженном угнетающем действии 3-НПК на этот фермент [10]. Учитывая то, что при этом наблюдаются также значительные нарушения карбонилирования белков (см. таблицу 1), можно предположить, что такое угнетение активности СДГ связано с мисфолдингом фермента, так как молекула СДГ состоит из нескольких субъединиц, для правильной сборки которых в несколько этапов требуется ряд белков [23].

Нами установлено, что при этом произошло также выраженное угнетение активности ОГДГ (на 44 %), но активация аконитазы (почти в 1,5 раза) в этой структуре мозга. Одновременно произошло угнетение активности цитохромоксидазы практически в 2 раза, что, очевидно, свидетельствует о выраженном метаболическом дисбалансе в процессах образования энергии под влиянием 3-НПК. Введение ПЛ оказалось не в состоянии снять ингибирующее действие нейротоксиканта на активность СДГ, однако ослабило его эффекты на активность аконитазы, оксоглутаратдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Аналогичными были эффекты ПТ. Введение ГПК несколько более выраженно способствовало восстановлению активности аконитазы и оксоглутаратдегидрогеназы.

Табл. 3. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на активность ферментов энергетического метаболизма в больших полушариях мозга (M±SD)

Группы	Аконитаза, нмоль/мин/мг белка	Оксоглутаратдегидрогеназа, нмоль/мин/мг белка	СДГ, нмоль/мин/мг белка	Цитохром С-оксидазы, нмоль/мин/мг белка
Контроль	44,71±1,56	7,85±1,17	67,68±5,16	5,43 ± 0,19
НПК	66,80±4,27*	4,34±0,76*	35,48±4,50*	2,76 ± 0,17*
НПК+ПЛ	51,99±2,01*#	5,59±0,35	26,87±1,59*	3,71± 0,15*#
НПК+ПТ	70,05±2,29*	6,82±0,71#	27,26±1,80*	3,18 ± 0,25*
НПК + ГПК	40,87±1,73#	7,60±0,66#	36,37±1,96*	3,33± 0,12*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК

Изменения процессов образования энергии в больших полушариях мозга при действии 3-НПК сопровождались повышением активности и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (на 13 %), и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (на 15 %), что свидетельствует об усилении метаболизма по пентозофосфатному пути (таблица 4). Введение ПЛ и ПТ приводило к возвращению активности обоих ферментов к значениям таковых в контрольной группе, тогда как ГПК практически не оказал влияния на эти показатели.

Табл. 4. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-Ф-ДГ) и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы (6-Ф-Гл-ДГ) в больших полушариях мозга (M±SD)

Группы	Гл-6-Ф-ДГ нмоль НАДФН/мин/мг белка	6-Ф-Гл-ДГ нмоль НАДФН/мин/мг белка
Контроль	43,3±0,8	48,1±0,9
НПК	48,8±0,6*	55,2±0,8*
НПК+ПЛ	42,9±1,0#	49,8±0,5#
НПК+ПТ	43,9±0,8#	48,7±1,0#
НПК + ГПК	46,8±1,5*	53,8±0,7*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК.

Заключение. Моделирование нейродегенеративной патологии посредством введения 3-НПК сопровождается выраженной активацией образования продуктов перекисного окисления липидов и снижением восстановительного потенциала и в крови, и в больших полушариях мозга, что является характерной чертой метаболических нарушений при многих нейродегенеративных заболеваниях.

Пантенол и пантетин, вводимые на фоне действия 3-нитропропионовой кислоты, проявляют нейропротекторное действие в отношении процессов липоперекисного окисления и энергообеспечения в больших полушариях мозга, а также возвращают показатели окислительного стресса и карбонилирования в плазме крови к значениям контрольной группы. ГПК действует слабее на выраженность окислительного стресса как в крови, так и в мозге, а также проявляет меньшую способность на восстановление процессов энергообеспечения в мозге, что, по-видимому, обусловлено

тем, что ГПК может нарушать биосинтез КоА, тогда как пантенол и пантетин являются его предшественниками.

Литература:

- [1] Пономарев В.В. Нейродегенеративные заболевания СПб.: Фолиант, 2013. 200 с.
- [2] Dias V., Junn E., Mouradian M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease // J. Parkinson's Dis. 2013. vol. 3. p. 461–491.
- [3] Rego A. C., Oliveira C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // Neurochemical Research. 2003. vol. 28. p. 1563–1574.
- [4] Zuo L. et al. Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly // Acta Physiologica. 2015. vol. 214. p. 329–348.
- [5] Lin M. T., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // Nature. 2006. vol. 443. p. 787–795.
- [6] Liu Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications [Electronic resource] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785371>. – Data of access: 18.05.2018.
- [7] Mochel F., Haller R. G. Energy deficit in Huntington disease: why it matters // The Journal of Clinical Investigation. 2011. vol. 121. p. 493–499.
- [8] Covarrubias-Pinto A., Moll P., Solis-Maldonado M. Beyond the redox imbalance: oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease // Free Radical Biology and Medicine. 2015. Vol. 89. p. 1085–1096.
- [9] Kumar P. et al. 3-Nitropropionic acid induced neurotoxicity: An animal model for Huntington's disease // J. Cell Tissue Res. 2007. Vol. 7, № 1. P. 853–860.
- [10] Huang L. S. et al. 3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, № 9. P. 5965–5972.
- [11] Kumar P. et al. Protective effect of sesamol against 3-nitropropionic acid-induced cognitive dysfunction and altered glutathione redox balance in rats // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2010. Vol. 107, № 1. P. 577–582.
- [12] Семенович Д. С. Система глутатиона и S-глутатионилирование белков в базальных ганглиях головного мозга крыс при действии митохондриальных нейротоксинов и производных пантотеновой кислоты // Новости медико-биологических наук. 2019. Т. 19, № 2. С. 47–52.
- [13] Семенович Д. С. и др. Эффект модуляторов системы биосинтеза кофермента А на проявления метаболического стресса и систему глутатиона в ЦНС при алюминиевом нейротоксикозе // Нейрохимия. 2023. Т. 40, № 1. С. 48–58.
- [14] Verde V. et al. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma // Free Radical Research. 2002. Vol. 36, № 8. P. 869–873.
- [15] Stocks J. et al. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids // Clinical Science and Molecular Medicine. 1974. Vol. 47. P. 215–222.
- [16] Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации под ред. В. Х. Хавинсона. СПб, 2000. 103 с.
- [17] Durfinova M. et al. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in Rat Brain Tissues // Chem. Pap. 2007. Vol. 61, № 4. P. 321–325.
- [18] Reisch A. S., Elpeleg O. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc // Methods Cell Biol. 2007. Vol. 80. P. 199–222.
- [19] Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: Лаборатория знаний, 2013. 132 с.
- [20] Рогожин В. В. Практикум по биохимии.: СПб.: Изд. Лань, 2013. С. 338–339.
- [21] Quirós, P. M. Determination of Aconitase Activity: A Substrate of the Mitochondrial Ion Protease // Methods in Molecular Biology. 2018. Vol. 1731. P. 49–56.
- [22] Ninfali P., Alnigi A., Pompella A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity is higher in the olfactory bulb than in other brain regions // Brain Res. 1997. Vol. 744. P. 138–142.
- [23] Moosavi B., et al. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics // Cell Mol. Life Sci. 2019 Vol. 76, № 20. P. 4023–4042.

O. V. TITKO¹, N. P. KANUNNIKOVA^{1,2}, D. S. SEMENOVICH³

**CHANGES IN PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN RATS
IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE AND THE EFFECT OF
PANTOTHENIC ACID DERIVATIVES**

¹ *State Enterprise "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus", Grodno, Republic of Belarus*

² *Educational institution "Yanka Kupala Grodno State University", Grodno, Republic of Belarus*

³ *Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology named after A. N. Belozersky Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russian Federation*

Summary

Changes in parameters of oxidative stress and energy metabolism in the blood and brain hemispheres of rats were studied in a model of neurodegenerative pathology carried out by administering 3-nitropropionic acid (3-NPA) to animals, as well as the protective properties of pantothenic acid derivatives. It has been shown that the administration of 3-NPA leads to the development of oxidative stress not only in the brain, but also at the level of the whole organism. At the same time, significant changes occur in both energy metabolism and the pentose phosphate pathway in the brain hemispheres. Panthenol and pantethine, administered against the background of the action of 3-NPA, exhibit protective effects on parameters of oxidative stress and energy metabolism not only in the brain hemispheres, but also return parameters of oxidative stress and protein carbonylation in blood plasma to the values of the control group. Hopanthenic acid has a weaker effect on the above violations both in the blood and in the brain.

Key words: oxidative stress, energy metabolism, brain hemispheres, 3-nitropropionic acid, neurodegenerative diseases.